

Variabilidad genética de *Pintomyia evansi* en el departamento de Córdoba mediante Citocromo Oxidasa I – Código de barras.

Genetic variability of *Pintomyia evansi* in the department of Córdoba using Cytochrome Oxidase I – Barcode.

Dayana Marcela Bohórquez H^{1*}, María Fernanda Yasnot A², Richard Onalbi Hoyos L³

RESUMEN

Objetivo. Determinar la variabilidad genética de *Pintomyia evansi* en localidades del departamento de Córdoba con base en el gen Citocromo Oxidasa I (COI) como marcador molecular de la especie. **Materiales y métodos.** Se realizaron recolecciones entomológicas en las localidades de Galilea, Puerto Anchica, Centro Alegre, Pica Pica Viejo, Nuevo Oriente y Zaino del departamento de Córdoba. Se utilizó como marcador genético la región de código de barras de ADN del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I. El análisis genético incluyó parámetros de diversidad genética, la prueba D de neutralidad Tajima, estructura genética, flujo génico y relaciones filogenéticas. **Resultados.** Se obtuvieron 37 secuencias a partir de las muestras en el departamento de Córdoba y 4 secuencias de Sucre (GenBank), para un total de 41 secuencias con un tamaño de 556 nucleótidos del gen COI. La resultados de la prueba D de Tajima fueron negativos y no significativos ($p > 0,10$). Los valores de distancias genéticas entre poblaciones fueron bajas con un rango de 0,00636 – 0,01191, con valores de variabilidad intraespecífica $< 3\%$. Los estimadores de estructura génica y flujo de genes Nm (1.74 – 574.21) evidenciaron que no hubo diferenciación genética en las poblaciones muestreadas debido al alto flujo de migrantes. El árbol filogenético de inferencia bayesiana muestra una sola especie sin diferenciación de linajes en el rango geográfico estudiado. **Conclusión.** Las poblaciones estudiadas de *Pi. evansi* en Córdoba y sucre, aparecieron homogéneas entre sí, indicando que las poblaciones están en un intercambio constante de migrantes.

Palabras clave: *Pintomyia evansi*, Variabilidad genética, Citocromo Oxidasa I, flujo génico, estructura genética.

ABSTRACT

Objective. To determine the genetic variability of *Pintomyia evansi* in localities of the department of Córdoba based on the Cytochrome Oxidase I (COI) gene a molecular marker of the species. **Materials and methods.** Entomological collections were made in the towns of Galilea, Puerto Anchica, Centro Alegre, Pica Pica Viejo, Nuevo Oriente and Zaino in the department of Córdoba. The DNA barcode region of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I was used as a genetic marker. The genetic analysis included parameters of genetic diversity, the Tajima neutrality test D, genetic structure, gene flow, and phylogenetic relationships. **Results.** Were obtained 37 sequences from the department of Córdoba and 4 sequences from Sucre (GenBank), for a total of 41 sequences with a size of 556 nucleotides of the COI gene. The results of the Tajima D test were negative and not significant ($p > 0.10$). The values of genetic distances between populations were low with a range of 0.00636 - 0.01191, with values of specific divergence $< 3\%$. The gene structure and gene flow Nm (1.74 - 574.21) showed that there was no genetic differentiation in the sampled populations due to the high flow of migrants. The phylogenetic tree of Bayesian inference shows a single species without differentiation of lineages in the geographic range studied. **Conclusions.** The studied populations of *Pi. evansi* in Córdoba and Sucre, appeared homogeneous among themselves, indicating that the populations are in a constant exchange of migrants.

Keywords: *Pintomyia evansi*, Genetic variability, Cytochrome Oxidase I, gene flow, genetic structure.

1. Estudiante de Bacteriología, Universidad de Córdoba, Colombia
2. Ph.D. en Ciencias Biomédicas, Profesor Titular Universidad de Córdoba, Colombia, Grupo de investigaciones microbiológicas y biomédicas de Córdoba.
3. Ph.D. en Biología, Docente Investigador Universidad del Sinú, Colombia, Grupo de investigación de enfermedades tropicales y resistencia bacteriana. *Correspondencia: dahezz.2309@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

Pintomyia evansi es reconocido como uno de los principales vectores del parásito *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, (1) agente etiológico de la leishmaniasis visceral (LV), una de las formas más severas de la enfermedad. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) del 2019, en las Américas se presenta un promedio anual de 3.516 casos, donde Brasil reporta el 96% de los casos, seguido de Argentina, Colombia, Paraguay y Venezuela países suramericanos que reportan el mayor registro de casos (2). Esta enfermedad que anteriormente solo se presentaba en áreas rurales, también está ocurriendo en hábitats urbanas y periurbanas de Brasil, Venezuela y Colombia (3,4), situación que se le puede atribuir a la migración humana y cambios climáticos o ambientales que afectan a las poblaciones de estas vectores, algunos de los cuales se adaptan a estos ambientes antropogénicos (5).

Actualmente en Colombia *Pi. evansi* se encuentra distribuido en los departamentos de Antioquia, Casanare, Córdoba, La Guajira, Bolívar, Magdalena,

Sucre, Norte de Santander y Santander (6,7).

El gen Citocromo Oxidasa I (COI) ha sido propuesto como “Código de Barras del ADN” y ocupa una posición intermedia entre el análisis de filogenia molecular y genética de poblaciones, es decir que tiene utilidad para evaluar estructuración poblacional, el flujo de genes y las relaciones evolutivas (8).

El objetivo del presente estudio fue establecer como se relacionan las poblaciones de *Pi. evansi* en diferentes localidades del departamento de Córdoba, incluyendo poblaciones de Colosó, Sucre y Norte de Santander, secuencias obtenidas a partir de GenBank, evaluando la diversidad de haplotipos, calculando el flujo génico y haciendo la diferenciación genética de las poblaciones muestreadas, así como la relación filogenética de los individuos recolectados mediante el método del código de barras (DNA Barcode) gen citocromo oxidasa I (COI), información relevante en el contexto de la epidemiología y el control de vectores.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio que se realizó es de carácter descriptivo, de corte transversal.

Recolección y procesamiento de las muestras

Las recolecciones se realizaron entre julio y octubre del 2018 en seis municipios del departamento de Córdoba (figura 1) (tabla 1) utilizando trampas CDC y una trampa Shannon durante tres días, entre las 18:00 y las 24:00 horas. La identificación taxonómica de *Pi. evansi* se basó en claves de Young (1979) (9). El ADN se extrajo del tórax y las patas de los flebotomíneos utilizando el método descrito por Collins (Grind Buffer) (1987) y la metodología estandarizada por Hoyos, 2012 (10).

Amplificación de la región de código de barras del gen COI

Los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento Citocromo Oxidasa I fueron LCO1490 GGTCACAAATCATAAAGATATTGG (forward) y HCO2198-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (reverse) (11). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un termociclador PTC – 100 bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos; seguido de 35 ciclos a 94°C por un minuto, un alineamiento a 45°C por 1:50 minutos, una extensión a 72°C por

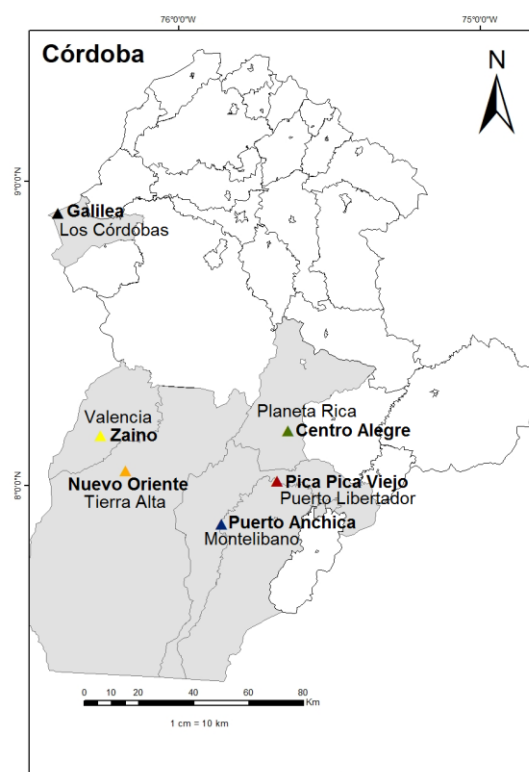


Figura 1. Distribución de las localidades de recolección de *Pintomyia evansi* en el departamento de Córdoba, Colombia.

Tabla 1. Sitios de recolección de *Pintomyia evansi* en el departamento de Córdoba, Colombia.

Municipio, localidad	Coordenadas (latitud, longitud)
Los córdobas, Galilea	8°53'41.59"N - 76°23'50.88"O
Valencia, Zaino	8°09'50.78"N - 76°15'07.87"O
Tierra Alta, Nuevo Oriente	8°02'57.14"N - 76°10'11.20"O
Puerto Libertador, Pica Pica Viejo	8°01'00.46"N - 75°40'06.69"O
Montelibano, Puerto Anchica	7°52'29.54"N - 75°51'07.17"O
Planeta Rica, Centro Alegre	8°10'58.02"N - 75°37'59.33"O

1:50 minutos, y un paso final a 72°C a 5 minutos. El volumen final de la PCR fue de 50 uL y contenía: buffer PCR 10X

(NH₄SO₄), MgCL₂ (25 mM), oligonucleótidos (2mM), DNTPs (100 mM), 4 uL ADN-muestras y 0,5 unidades Taq polimerasa.

Los productos amplificados, teñidos con Bromuro de etidio, se visualizaron mediante electroforesis en el gel de agarosa al 1%. Al gel se le aplicó un voltaje de 90 voltios con una fuente de poder, durante 45 minutos para que el ADN migrara y luego se transfirió a una fuente de luz U.V.

El fragmento amplificado se secuenció en ambos sentidos de la cadena, en un secuenciador automático ABI 310 en Macrogen (Seúl, Corea del sur).

Análisis de datos.

Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el programa Bioedit v7.0.9 (12). A cada secuencia de consenso se le hizo el alineamiento con el programa BLASTn, con el fin de comparar las secuencias de *Pi. evansi* almacenadas en GenBank y en *Barcode of Life Data System* (Bold System).

El número de haplotipos, el número de sitios polimórficos (S), el número promedio de diferencias de nucleótidos (k), la diversidad de haplotipos (DH), la diversidad de nucleótidos (TT), la prueba

D de neutralidad de Tajima y los estimadores de estructura genética (Fst) se calcularon con el programa DnaSP versión 6 (13), el flujo génico (Nm) se estimó a partir de los resultados de Fst.

RESULTADOS

Alineamiento Citocromo Oxidasa I.

Se obtuvieron 37 secuencias del fragmento 5' del gen Citocromo Oxidasa I de *Pi. evansi* a partir de las seis localidades muestreadas y 4 secuencias GenBank (GU909456 – 59), para un total de 41 secuencias con un tamaño de 556 pb, la composición nucleotídica se caracterizó por un alto contenido de Adenina+Timina (67%) en relación con el contenido Guanina+Citocina (33%). El contenido individual promedio de nucleótidos fue: A= 27.5%, T= 39.5%, C= 17.3%, G= 15.7%. El alineamiento de 556 pb en CLUSTALW y posterior análisis en DnaSP v6 permitió identificar 514 sitios conservados y 42 sitios polimórficos (tabla 2). Del total de las 41 secuencias analizadas se obtuvieron 38 haplotipos mitocondriales del gen COI (tabla 3).

Estimadores de diversidad genética, prueba de neutralidad y estructura genética.

Tabla 2. Sitios polimórficos

Sitios	Número de posiciones	Posiciones
Sitios polimórficos de dos variantes	22	30, 53, 99, 137, 140, 146, 153, 162, 164, 221, 230, 267, 302, 317, 350, 359, 407, 452, 464, 530, 534, 539.
Sitios parsimoniosamente informativos de dos variantes	15	14, 32, 35, 158, 227, 260, 272, 284, 314, 320, 362, 440, 494, 518, 545.
Sitios polimórficos de tres variantes	0	-
Sitios parsimoniosamente informativos de tres variantes	4	173, 293, 329, 500.
Sitios polimórficos de cuatro variantes	1	521
Sitios parsimoniosamente informativos de cuatro variantes	0	-

Los parámetros de diversidad genética y la prueba de neutralidad para cada uno de las poblaciones estudiadas de *Pi. evansi* se muestran en el (tabla 4). Los promedios más altos en K y TT fueron los correspondientes a la localidad de Galilea (Los Córdoba) y Centro Alegre (Planeta Rica). La prueba de neutralidad Test Tajima's D arrojó valores negativos, con excepción de Galilea (Los Córdoba), pero no fue significativa ($p > 0,10$).

Las distancia genéticas entre las poblaciones fueron muy bajas, en un rango de 0,00636 a 0,01191, con valores de variación intraespecífico $< 2\%$ (14) (tabla 5). El análisis de estructuración poblacional mostró una diferenciación genética casi nula dentro de las localidades del departamento de Córdoba, aunque Norte de Santander a diferencia de las demás localidades

Tabla 4. Parámetros de diversidad genética y prueba de neutralidad de las poblaciones de *Pi. evansi* del departamento de Córdoba y una población de Colosó, Colombia. NH: número de haplotipos en cada población; S: sitios polimórficos; K: número de promedios de divergencias nucleotídicas; DH: diversidad de haplotipos; TT: diversidad nucleotídica.

Municipio	Localidad	NH	S	K	DH	TT	Tajima's D
Los Córdoba	Galilea	4	11	6,00000	1,000	0,01079	0,00000
Tierra Alta	Nuevo Oriente	9	14	4,44444	1,000	0,00799	-0,93953
Puerto Libertador	Pica Pica Viejo	8	14	3,82143	1,000	0,00687	-1,48812
Montelibano	Puerto Anchica	4	8	4,50000	1,000	0,00809	-0,82943
Planeta Rica	Centro Alegre	11	26	7,18182	1,000	0,01292	-1,14893
Colosó	Colosó	4	10	5,16667	1,000	0,00929	-0,52807
Total		38	42	5,35122	0,996	0,00962	-1,85213

Tabla 3. Sitios polimórficos en la secuencia del gen COI en haplotipos de *Pintomyia evansi* en Córdoba, Colombia.

Sitios polimórficos	
Haplotipos	
	<div> <div>10</div> <div>20</div> <div>30</div> <div>40</div> </div>
	<div> <div>*</div> <div>*</div> <div>*</div> <div>*</div> </div>
Pinyomyia_evansi	CCAATGAAATGCAAAC TGAGTTTCTCATATACATTTCGTTTAC
Pintomyia_evansiCA....T....A....G.....TA.....
Pintomyia_evansiA.....
Pintomyia_evansiG....G.T...A.A.....A.....
Pintomyia_evansiA.....
Pintomyia_evansiT....A.....
Pintomyia_evansiT....A...T.....
Pintomyia_evansiT.A.CA.....A.....
Pintomyia_evansiT...A.A...T...T.....
Pintomyia_evansiT...CA...G.....A.C..
Pintomyia_evansiT...TC..A.A.....A.....
Pintomyia_evansiG.T...CA.....A.A.....
Pintomyia_evansiG.T...A..C.....A.....
Pintomyia_evansiT...CA...G.....A.....
Pintomyia_evansi	...C.....T....A.....
Pintomyia_evansiG..A..G.T...ACA.....C.....
Pintomyia_evansiT...CA.....A.....
Pintomyia_evansiT....A.....
Pintomyia_evansiT...CG.....
Pintomyia_evansiT...CA...G.....
Pintomyia_evansi	...A.....T....A...T.....G.
Pintomyia_evansi	..G.....T....A.....
Pintomyia_evansiG.T.A...A.....A.....
Pintomyia_evansi	...G.....T....A...T.....
Pintomyia_evansiC.T...CA.....A.....
Pintomyia_evansiT..G..A...T.....
Pintomyia_evansiT....A.....T.....
Pintomyia_evansi	.T.....T....A...TG.....A.....
Pintomyia_evansiT...CA....C.....C.....
Pintomyia_evansiT....A....G.....A.....
Pintomyia_evansi	T.....GG.T...A.A...G...T....G...
Pintomyia_evansiT....A...T.....
Pintomyia_evansiT...CA.T..G.....A.....
Pintomyia_evansiG..A...T....AC...G...G.....
Pintomyia_evansi	T.....A..G.T...ACA.T....C.....
Pintomyia_evansiGT...ACA.....C.....
Pintomyia_evansi	...G.....A.....GT.....T
GU909459.1G.T...ACA.....A.....
GU909458.1G.T...CA.....C...
GU909457.1T...ACA.....C.....
GU909456.1	..GG.....A...T...A.A.....T

mostró resultados moderados y alto, este último el valor entre Norte de Santander y Colosó ($F_{st} = 0.22273$). Además se

observó un elevado intercambio de migrantes Nm (1.74 – 574.21) (tabla 6).

Tabla 5. Distancias genéticas (Kimura 2-parametros) (abajo de la diagonal) entre las poblaciones muestreadas y secuencias de Colosó, Sucre y Norte de Santander. Desviación estándar (arriba de la diagonal).

Localidad	Galilea	Zaino	Nuevo Oriente	Pica Pica Viejo	Puerto Anchica	Centro Alegre	Colosó	Santander
Galilea	-	0,00193	0,00247	0,00229	0,00258	0,00240	0,00264	0,00266
Zaino	0,00636	-	0,00322	0,00305	0,00346	0,00287	0,00310	0,00309
Nuevo Oriente	0,00998	0,00967	-	0,00190	0,00231	0,00217	0,00233	0,00235
Pica Pica Viejo	0,00942	0,00861	0,00746	-	0,00206	0,00193	0,00216	0,00211
Puerto Anchica	0,01009	0,00997	0,00806	0,00742	-	0,00228	0,00268	0,00276
Centro Alegre	0,01191	0,01090	0,01056	0,00988	0,01083	-	0,00233	0,00225
Colosó	0,01090	0,00952	0,00913	0,00828	0,00953	0,01129	-	0,00199
Norte de Santander	0,01060	0,00876	0,00877	0,00771	0,00938	0,01072	0,00666	-

Tabla 6. Índice de estructuración genética (F_{st}) (números en negrillas) y el número de migrantes (Nm) (números en cursiva).

Localidad	Galilea	Nuevo Oriente	Pica Pica viejo	Puerto Anchica	Centro Alegre	Colosó	Norte de Santander
Galilea	-	<i>9.39</i>	<i>8.87</i>	<i>8.39</i>	<i>71.54</i>	<i>6.70</i>	<i>2.62</i>
Nuevo Oriente	0.05051	-	<i>93.66</i>	<i>79.5</i>	<i>574.21</i>	<i>10.81</i>	<i>2.89</i>
Pica Pica Viejo	0.05336	0.00531	-	<i>30.06</i>	<i>38.41</i>	<i>32.83</i>	<i>4.33</i>
Puerto Anchica	0.05618	0.00625	0.01636	-	<i>25.70</i>	<i>5.79</i>	<i>2.04</i>
Centro Alegre	0.00694	0.00087	0.01285	0.01908	-	<i>101.95</i>	<i>6.81</i>
Colosó	0.06944	0.04420	0.01500	0.07937	0.00488	-	<i>1.74</i>
Norte de Santander	0.16000	0.14713	0.10336	0.19677	0.06838	0.22273	-

Pi. evansi en Córdoba, Sucre y Norte de Santander (figura 2).

El árbol obtenido con inferencia bayesiana evidencio un único linaje para

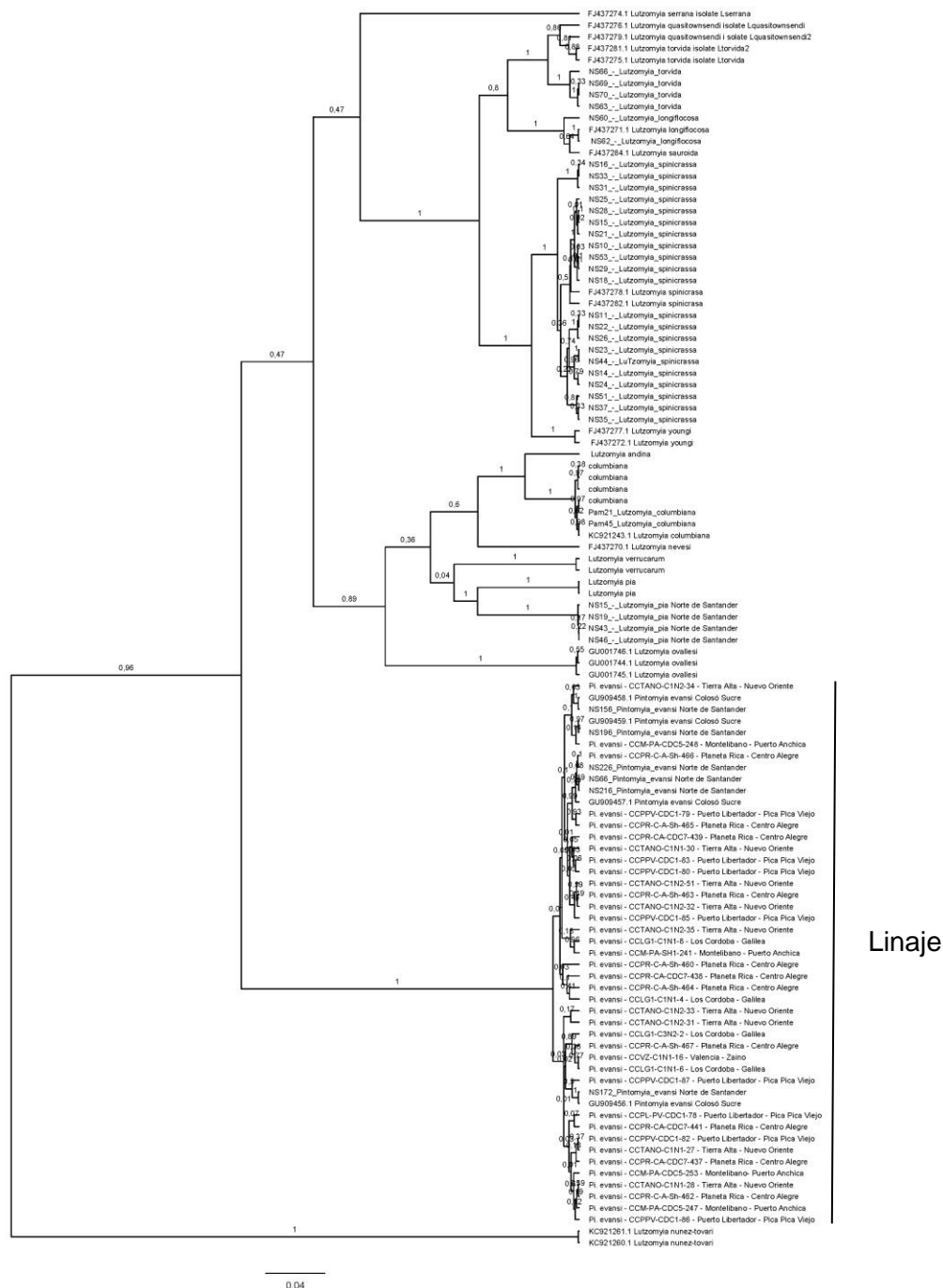


Figura 2. Árbol de inferencia bayesiana con secuencia del gen COI de seis poblaciones de *Pi. evansi* del departamento de Córdoba y secuencias GenBank del grupo *Verrucarum*.

DISCUSIÓN

La secuenciación del ADN mitocondrial en la actualidad es considerada una herramienta fundamental para el monitoreo de las poblaciones, ya que contribuye a definir los límites de las poblaciones, estudiar su estructura, revelar patrones de migración, estimar flujo génico interpoblacional y detectar la posible declinación de las mismas, además es utilizada para realizar estudios filogenéticos de poblaciones o especies próximas (15).

En los valores obtenidos de estructuración poblacional (F_{st}) y flujo de genes (Nm) se muestra que existe un gran flujo de migrantes entre las poblaciones muestreadas en el departamento de Córdoba y una estructura genética nula; es decir la diversidad genética de haplotipos y los valores de la prueba D de Tajima corresponden a una expansión de la población y no a la presión selectiva, lo cual implica que *Pi. evansi* comprende una sola población. Resultados semejantes consiguieron Bejarano *et al* 2001 en su estudio de ejemplares de *Pi. evansi* en la Costa Caribe colombiana y una población de Venezuela, concluyeron la existencia de un gran flujo de genes entre una población endémica

para la LV y una población urbana del Caribe, además las poblaciones se caracterizaron por aparecer homogéneas entre sí, exceptuando la población venezolana (1).

Por otra parte cabe resaltar que en el presente estudio se observaron bajas distancias genéticas entre las poblaciones estudiadas, estimadas a partir del modelo biparamétrico de Kimura ($K2P$), valores que oscilaron entre 0.00636 – 0,01191, mostrando valores de variación intraespecífica $<2\%$ estando dentro del rango propuesto por Hebert *et al.* para insectos (16), un patrón similar de variabilidad genética se observó en una población urbana de *Pintomyia evansi* en Sincelejo, Sucre, donde se obtuvieron valores de 0,0032 – 0,0194, el análisis reveló una baja variabilidad genética dentro de especímenes de localidades urbanas y rurales (17). Este comportamiento podría tener implicaciones a nivel epidemiológico, debido a que las hembras potencialmente infectadas podrían estar migrando de zonas rurales a zonas urbanas favoreciendo así nuevos microfocos de transmisión (18), tal como se muestra en un estudio por Bejarano *et al*, 2002 donde se asocia a *Pi. evansi* con casos de leishmaniasis en

la ciudad de Sincelejo, Sucre (4). Con base en lo anterior y en los resultados obtenidos se puede inferir que este vector a pesar de poseer un alto polimorfismo, debido a su baja variabilidad genética se comporta como una gran población.

Si bien en los estudios realizados por Bejarano *et al.* el gen mitocondrial utilizado es Citocromo b, Rosero *et al.*, 2016 en su estudio de marcadores moleculares como herramientas en la identificación y análisis genético de especies del género *Lutzomyia* (grupo *Verrucarum*) llegaron a la conclusión que el Citocromo Oxidasa I es más efectivo para observar las relaciones filogenéticas y que el gen Citocromo b posee carácter taxonómico alternativo (19).

A partir de lo anterior según la inferencia filogenética bayesiana efectuada en el actual estudio, los ejemplares de *Pi. evansi* en Córdoba, Sucre y Norte de Santander se agruparon en un solo clado, mostrando únicamente un linaje monofilético, indicando una diferenciación genética nula entre las poblaciones sometidas a prueba.

En estudios semejantes en otras especies donde se ha empleado el gen COI como “código de barras del ADN”

como el realizado por Carrero & Hoyos 2018, en *Lutzomyia gomezi* les permitió identificar tres linajes a partir de las distancias genéticas (0,026 – 0,48), un alto polimorfismo y una divergencia intraespecífica >6%, colocándola como una especie críptica (20). Hoyos *et al.* 2012 utilizando el fragmento Citocromo Oxidasa I discriminaron haplotipos de *Lutzomyia longipalpis* de secuencias pertenecientes a *L. gomezi*, *L. cruciata* y *L. bifoliata* ubicadas dentro del subgénero *Lutzomyia* (10). Asimismo este marcador molecular también ha sido utilizado en el estudio de la diversidad genética y estructura poblacional de otros dípteros de importancia en salud pública como es el caso de *Anopheles triannulatus* s. l en Córdoba por Atencia *et al* donde les permitió evidenciar una diferenciación genética y estructura poblacional nula dentro de los ejemplares muestreados y un gran flujo de migrantes dentro de las poblaciones analizadas (21). Por otra parte Toro & Hoyos 2018, usando el citocromo oxidasa I lograron identificar cinco haplotipos de *Deinocerites atlanticus* un mosquito que en ocasiones puede considerarse como transmisor de arbovirus de importancia en salud pública (22).

Emplear el gen COI como “Código de barras del ADN” ayuda a responder preguntas acerca de filogeografía, competencia vectorial y estructuración genética entre poblaciones utilizando un marcador común para la comunidad científica (20).

CONCLUSIÓN.

Según los resultados obtenidos en este estudio, las poblaciones de *Pintomyia evansi* en Córdoba tienen un comportamiento de metapoblación, con un gran flujo de migrantes entre las localidades de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación de Enfermedades Tropicales y Resistencia Bacteriana de la Universidad del Sinú - Sede Montería por el financiamiento del proyecto y al Dr Richard Onalbi Hoyos López por su incesante apoyo y asesoría.

CONFLICTO DE INTERÉS.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS.

1. Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID, Porter C. Variabilidad genética en *Lutzomyia* (verrucarum) *evansi* (Núñez-Tovar, 1924), vector de Leishmaniasis visceral americana. *Iatreia* [Internet]. 2001;14(4):2001. Available from: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/3853>
2. Maia-Elkhoury AN, Branco Valadas SY, Nicholls S, Puppim Buzanovsky L. LEISHMANIASIS Informe Epidemiológico de las Américas [Internet]. Washington; 2019. Available from: www.paho.org/leishmaniasis
3. Cortés LA, Fernández JJ. Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia Luis. *Biomedica* [Internet]. 2008;28:433–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19034365>
4. Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the City of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet].

- 2002;97(5):645–7. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v97n5/4479.pdf>
5. Walsh JF, Molyneuxf DH, Birley MH. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology*. 1993;106:55–75.
6. Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C. Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. *PLoS One*. 2015;10(10):1–16.
7. González C, Cabrera OL, Munstermann LE, Ferro C. Distribución de los vectores de *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Colombia. *Biomédica*. 2006;26(1):64–72.
8. Hajibabaei M, Singer GAC, Clare EL, Hebert PDN. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biol*. 2007;5:1–7.
9. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the west indies, central and south America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, Florida: Associated Publishers; 1994.
10. Hoyos L R, Uribe S S, Vélez I. Tipificación de especímenes colombianos de *lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae) mediante “código de barras.” *Rev Colomb Entomol*. 2012;38(1):134–40.
11. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2003;270(1512):313–21.
12. Hall TA. BioEdit: user friendly biological sequence alignment editor 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* [Internet]. 1999;41:95–8. Available from: <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
13. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1451–2.
14. Contreras Gutiérrez MA, Vivero RJ, Vélez ID, Porter CH, Uribe S. DNA barcoding for the

- identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. PLoS One. 2014;9(1).
15. Lanteri AA, Loíacono MS, Margaría C. Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos [Internet]. Vol. 2, Monografías Tercer Milenio. 2002. Available from: http://www.sea-entomologia.org/PDF/M3M_PRIBES_2002/207_220_Lanteri.pdf
 16. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard J. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. R Soc. 2003;(figure 1):96–9.
 17. Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID, Porter CH. Genetic analysis of a recently detected urban population of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) in Colombia. Rev la Soc Entomol Argentina [Internet]. 2009;68(1–2):135–41. Available from: <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/29996>
 18. Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID. Sistemática de especies de *Lutzomyia* del grupo verrucarum Theodor, 1965 (Diptera: Psychodiadae). Biomédica. 2003;23(1):87.
 19. Rosero-Galindo CY, Montenegro Coral FA, García López JP. Marcadores moleculares como herramientas en la identificación y análisis genético de especies vectores de interés en salud pública, género *Lutzomyia* (Grupo Verrucarum Theodor, 1965). Univ y Salud. 2016;18(1):138–55.
 20. Carrero-Sarmiento D, Hoyos-López R. Molecular identification and genetic diversity of *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae) using DNA-barcodes in Cordoba, Colombia. Trop Biomed [Internet]. 2018;35(1):100–10. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Richard_Hoyos/publication/323839829_Molecular_identification_and_genetic_diversity_of_Lutzomyia_gomezi_Diptera_Psychodidae_using_DNA-barcodes_in_Cordoba_Colombia/links/5aafb7daaca2721710fcd82d/Molecular-identification-

21. Atencia-Pineda M, Toro-Cantillo A, Hoyos-López R. Diversidad genética y estructura poblacional de *Anopheles triannulatus* s.l. en Córdoba, Colombia, determinadas mediante el método de región de código de barras de ADN. *Biomédica*. 2018;38:117–26.
22. Toro-Cantillo A, Hoyos-López R. Molecular identification of *deinocerites atlanticus* (Adames, 1971) (diptera: Culicidae) using cytochrome oxidase I. *J Vector Borne Dis*. 2018;55(1):63–5.